



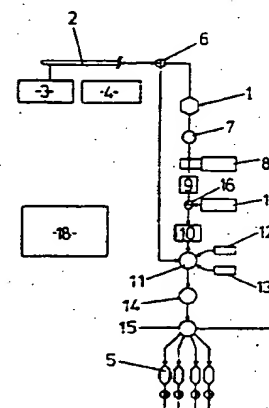
(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12Q 1/00, C12M 1/36		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/00969
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 9. Januar 1997 (09.01.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE96/01087		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 19. Juni 1996 (19.06.96)			
(30) Prioritätsdaten:		Veröffentlicht	
195 22 255.5	20. Juni 1995 (20.06.95)	DE	Mit internationalem Recherchenbericht.
195 27 880.1	29. Juli 1995 (29.07.95)	DE	Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen
196 17 731.6	3. Mai 1996 (03.05.96)	DE	Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen
(71)(72) Anmelder und Erfinder: SCHUMACHER, Johannes [DE/DE]; Hildastrasse 9, D-69181 Leimen (DE). WERLE, Bernd [DE/DE]; Konrad-Adenauer-Ring 6, D-69214 Eppelheim (DE).		eintreffen.	

(54) Title: PROCESS AND DEVICE FOR DETERMINING THE ACTIVITY OF ENZYMES IN LIQUIDS, OR THE CONCENTRATION AND/OR ACTIVITY OF INHIBITORS IN LIQUIDS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR BESTIMMUNG DER AKTIVITÄT VON ENZYMEN IN FLÜSSIGKEITEN, BEZIEHUNGSWEISE DER KONZENTRATION UND/ODER AKTIVITÄT VON INHIBITOREN IN FLÜSSIGKEITEN

(57) Abstract

A process and device are disclosed to determine the activity of enzymes in liquids in a largely automatic manner. The device for carrying out this process has a column (1) with a chromatographic carrier for treating a measurement sample. The carrier is mixed with a substance capable of binding to an enzyme inhibitor present in the measurement sample and that corresponds to at least one enzyme. A measurement sample supply (2) is associated to one end of the column (1). A valve/pump arrangement (7, 11, 14, 15) for filling at least one test tube (5) with a carrier and at least part of the measurement sample is connected downstream of the column (1), in the flow direction of the measurement sample. The carrier is dissociated into cleavage products by the action of the enzyme. The rise in concentration per unit of time of at least one of the cleavage products of the carrier is sensed during an incubation time. As an alternative or supplementary step, the enzyme that corresponds to at least one enzyme inhibitor is extracted by chromatography from a measurement sample to detect enzyme inhibitors in liquids and the thus treated measurement sample is tested for inhibitor concentration and/or activity.



(57) Zusammenfassung

Vorgeschlagen werden ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Bestimmung der Aktivität von Enzymen in Flüssigkeiten, die eine weitgehende Automatisierung des Meßvorganges ermöglichen. Die Vorrichtung zur Durchführung dieses Verfahrens umfaßt zur Behandlung einer Meßprobe eine Säule (1) mit einem chromatographischen Trägermaterial, wobei das Trägermaterial mit einer Substanz versetzt ist, welche in der Meßprobe vorliegende, mit mindestens einem Enzym korrespondierende Enzym-Inhibitoren bindet. Dem einen Ende der Säule (1) ist eine Zuführeinrichtung (2) für Meßproben zugeordnet. In Flußrichtung der Meßprobe, der Säule (1) nachgeschaltet, ist eine Ventil/Pumpen-Anordnung (7, 11, 14, 15) angeordnet, mit der mindestens ein Versuchsgefäß (5) mit einem Substrat und zumindest einem Teil der Meßprobe befüllbar ist. Das Substrat wird durch das Einwirken des Enzyms in Spaltprodukte aufgespalten. Mit Hilfe eines Detektors wird der Anstieg der Konzentration zumindest eines Spaltprodukts des Substrats pro Zeiteinheit während einer Inkubationszeit erfaßt. Ergänzend oder alternativ zum Obigen wird noch vorgeschlagen, einer Meßprobe zur Bestimmung der Enzyminhibitoren in Flüssigkeiten die mit mindestens einem Enzyminhibitor korrespondierenden Enzyme zu entziehen und die so behandelte Meßprobe auf die vorhandene Konzentration und/oder Aktivität der Inhibitoren zu untersuchen, wobei die Enzyme der Meßprobe auf chromatographischem Wege entzogen werden.

"Verfahren und Vorrichtung zur Bestimmung der Aktivität von Enzymen in Flüssigkeiten, beziehungsweise der Konzentration und/oder Aktivität von Inhibitoren in Flüssigkeiten."

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Bestimmung der Aktivität von Enzymen in Flüssigkeiten, beziehungsweise der Konzentration und/oder Aktivität von Inhibitoren in Flüssigkeiten.

Die Bestimmung von Enzymaktivitäten in Pflanzenextrakten, Bakteriensuspensionen, Homogenaten und Körperflüssigkeiten, wie Serum, Plasma, Harn, bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit, Punktat, Liquor, Zelllinien oder auch homogenisiertem Gewebe, hat für die Diagnostik und zur Verlaufs- bzw. Therapiekontrolle ganz wesentliche Bedeutung erlangt.

Beispielsweise in Serum ist die Unterscheidung zwischen Enzymproteinen und den übrigen Serumproteinen auf chemischem Wege äußerst problematisch. Dabei ist zu berücksichtigen, daß die Konzentrationen der einzelnen Enzyme in Körperflüssigkeiten außerordentlich gering sind. So enthält das Serum eines gesunden Menschen 0,1 µg Glutamat-Oxal-Azetat-Transaminase im Milliliter. Zum Vergleich sei erwähnt, daß die Gesamteiweißkonzentration 60 bis 80 mg/ml Serum beträgt, d.h. die Konzentrationen verhalten sich etwa wie 1:700.000. Da die Bestimmung der Enzymkonzentrationen auf chemischem Wege problematisch ist, berechnet man ihre Aktivität aus der Geschwindigkeit, mit der die Umsetzung eines geeigneten Substrats erfolgt.

Aus der klinischen Chemie ist das sogenannte ELISA-Verfahren bekannt, bei dem auf immunologischem Wege die Konzentrationen eines Enzyms und des entsprechenden Enzym-Inhibitor-Komplexes in einer Gewebeprobe bzw. in einer Meßprobe erfaßt werden. Eine Messung der Enzymaktivität ist nach diesem Verfahren nicht möglich, da hier lediglich Konzentrationen gemessen werden, wobei nicht berücksichtigt wird, daß ein Enzym sowohl in aktiver als auch in inhibierter Form vorliegen kann.

Aus dem Stand der Technik sind Verfahren bekannt, bei denen einer Meßprobe zunächst die mit einem bestimmten Enzym korrespondierenden Enzym-Inhibitoren entzogen werden und anschließend

die Aktivität dieses Enzyms bestimmt wird. Die bekannten Verfahren sind sehr aufwendig, was einerseits auf die verwendeten Meßproben in Form von Gewebeproben zurückzuführen ist und andererseits auf die Vorgehensweise, wie die Enzym-Inhibitoren der Meßprobe entzogen werden. Dazu wird die Meßprobe mit einer Substanz versetzt, die die Enzym-Inhibitoren an sich bindet. Um die Enzym-Inhibitoren möglichst vollständig zu binden, muß die Substanz über eine bestimmte Dauer auf die Meßprobe einwirken, wobei eine möglichst homogene Mischung zwischen Meßprobe und Substanz aufrechterhalten werden muß. Anschließend müssen die so behandelte Meßprobe und die Substanz in einem Trennverfahren separiert werden.

Davon ausgehend liegt der Erfindung nun die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Bestimmung der Aktivität von Enzymen in Flüssigkeiten anzugeben, welche eine weitgehende bis vollständige Automatisierung und also eine Rationalisierung der Meßmethode ermöglichen, sowie für additive oder alternative Anwendung zur Bestimmung der Konzentration und/oder Aktivität von Inhibitoren in Flüssigkeiten.

Das erfindungsgemäße Verfahren löst die voranstehende Aufgabe durch die Merkmale der Patentansprüche 1 oder 23. Danach ist ein Verfahren zur Bestimmung der Aktivität von Enzymen in Flüssigkeiten, bei dem einer Meßprobe die mit mindestens einem Enzym korrespondierenden Enzym-Inhibitoren oder die mit mindestens einem Inhibitor korrespondierenden Enzyme entzogen werden und bei dem die so behandelte Meßprobe mit einem Substrat versetzt wird, wobei das Substrat durch das Einwirken des Enzyms in Spaltprodukte aufgespalten wird und der Anstieg der Konzentration zumindest eines Spaltprodukts des Substrats pro Zeiteinheit während einer Inkubationszeit erfaßt wird, so ausgestaltet, daß die Enzym-Inhibitoren oder die Enzyme der Meßprobe auf chromatographischem Wege entzogen werden.

Erfindungsgemäß ist erkannt worden, daß die Enzym-Inhibitoren der Meßprobe auch entzogen werden können, ohne daß eine möglichst homogene Mischung zwischen der entsprechenden Substanz

und der Meßprobe hergestellt werden muß und anschließend ein aufwendiger Trennvorgang vorgenommen werden muß. In diesem Zusammenhang ist erkannt worden, daß das Mischen und Trennen auch auf chromatographischem Wege aber praktisch in einem Verfahrensschritt durchgeführt werden können. Besonders vorteilhaft daran ist, daß mit dem erfindungsgemäßen Verfahren nunmehr Enzymaktivitäten von in flüssiger Form vorliegenden Meßproben, d.h. von Körperflüssigkeiten aller Art sowie von homogenisierten Gewebeproben, bestimmt werden können, wobei das Entziehen der Enzym-Inhibitoren auf chromatographischem Wege eine weitgehend automatisierte Verfahrensführung ermöglicht.

Dazu wird die Meßprobe in vorteilhafter Weise durch eine Säule mit einem chromatographischen Trägermaterial geleitet, wobei das Trägermaterial mit einer die Enzym-Inhibitoren bindenden Substanz versetzt ist. Dabei reichern sich die Enzym-Inhibitoren in der Säule an, so daß also gleichzeitig, quasi als Nebenprodukt des erfindungsgemäßen Verfahrens auch eine Isolation der Enzym-Inhibitoren erreicht wird.

Um nun die Meßergebnisse verschiedener Meßvorgänge miteinander vergleichen zu können, müssen definierte Versuchsbedingungen eingehalten werden. Dazu kann die behandelte Meßprobe, d.h. die von Enzym-Inhibitoren bereinigte Meßprobe, mit einem geeigneten Säulenpuffer definiert verdünnt werden. Außerdem kann der Meßprobe ein je nach den Versuchsbedingungen und zu bestimmenden Enzymaktivitäten geeigneter Meßpuffer beigemischt werden. In einer vorteilhaften Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens läßt sich das Meßassay, d.h. die zumeist verdünnte Meßprobe in Verbindung mit dem Testsubstrat, das durch Einwirken des zu bestimmenden Enzyms in Spaltprodukte aufgespalten wird, während der Inkubationszeit temperieren.

Grundsätzlich gibt es verschiedene Möglichkeiten, um den Anstieg der Konzentration zumindest eines Spaltprodukts des Sub-

strats pro Zeiteinheit während der Inkubationszeit zu erfassen. Besonders vorteilhaft ist es, den Anstieg der Konzentration fluorometrisch zu bestimmen, da sich auf diese Weise besonders gut der Zeitverlauf des Konzentrationsanstiegs verfolgen läßt.

Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe wird außerdem durch eine Vorrichtung zur Bestimmung der Aktivität von Enzymen in Flüssigkeiten mit den Merkmalen des Patentanspruchs 7 gelöst. Danach ist zur Behandlung einer Meßprobe eine Säule mit einem chromatographischen Trägermaterial vorgesehen, wobei das Trägermaterial mit einer Substanz versetzt ist, welche in der Meßprobe vorliegende, mit mindestens einem Enzym korrespondierende Enzym-Inhibitoren bindet. Dem einen Ende der Säule ist eine Zuführeinrichtung für Meßproben zugeordnet. In Flußrichtung der Meßprobe, d.h. der Säule nachgeschaltet ist eine Ventil/Pumpen-Anordnung angeordnet, mit der mindestens ein Versuchsgefäß mit einem Substrat und zumindest einem Teil der Meßprobe befüllbar ist. Schließlich ist noch ein Detektor zum Erfassen des Anstiegs der Konzentration zumindest eines Spaltprodukts des Substrats pro Zeiteinheit vorgesehen.

Erfindungsgemäß ist erkannt worden, daß sich ein Verfahren zur Bestimmung der Aktivität von Enzymen bzw. Aktivität und/oder Konzentration von Inhibitoren in Flüssigkeiten, bei dem einer Meßprobe auf chromatographischem Wege die mit einem Enzym korrespondierenden Enzym-Inhibitoren bzw. Enzyme entzogen werden, in eine sequentielle Versuchsanordnung umsetzen läßt. Das heißt, eine Meßprobe durchläuft nacheinander verschiedene Stationen einer Versuchsanordnung, ohne daß die Meßprobe vor Beendigung des Versuchs der Versuchsanordnung entnommen werden muß und speziell behandelt werden muß. Besonders vorteilhaft in diesem Zusammenhang ist, daß die Messungen weitgehend automatisch durchgeführt werden können, indem einzelne Komponenten der Vorrichtung automatisch angesteuert und bedient werden.

In einer vorteilhaften Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist die Säule mehrfach verwendbar, d.h. es lassen sich mit einer Säule mehrere Meßproben hintereinander behandeln. Dazu herrscht in der Säule ein Überschuß an der Substanz, welche die in den Meßproben vorliegenden Enzym-Inhibitoren bindet. Die Menge bzw. der Überschuß an der Substanz bestimmen letztlich die Kapazität der Säule.

Von Vorteil ist es außerdem, wenn die Säule austauschbar ist. In diesem Falle kann einerseits eine verbrauchte Säule durch eine neue Säule ersetzt werden. Andererseits kann die erfindungsgemäße Vorrichtung dann auch für unterschiedliche Versuche präpariert werden, d.h. für die Messung von Aktivitäten unterschiedlicher Enzyme. Hierfür müssen den Meßproben jeweils unterschiedliche Enzym-Inhibitoren entzogen werden. Dementsprechend muß die Säule also mit unterschiedlichen Substanzen präpariert sein.

Im Hinblick auf eine Automatisierung des Meßverfahrens ist es vorteilhaft, wenn die Zuführeinrichtung nicht nur Zugriff auf einen Meßprobenspeicher, wie z. B. ein Probenrondell, hat sondern auch auf ein Reservoir eines Säulenpuffers. Der Säulenpuffer dient zum Nachspülen bzw. Durchspülen der Säule nach jeder Meßprobe, um ein Vermischen von unterschiedlichen Meßproben in der Säule und also eine Meßwertverfälschung zu vermeiden. Im Rahmen einer automatischen Verfahrensführung wird die Zuführeinrichtung dann also immer abwechselnd auf den Meßprobenspeicher und das Reservoir des Säulenpuffers zugreifen. Vorteilhaft ist es in diesem Zusammenhang auch, wenn der Säule nachgeschaltet eine Kontrollvorrichtung zum Überprüfen der Reinheit des aus der Säule austretenden Säulenpuffers vorgesehen ist. Eine solche Kontrollvorrichtung könnte beispielsweise photometrisch arbeiten oder auch Mittel zur Messung der Leitfähigkeit der aus der Säule austretenden Flüssigkeit umfassen.

Wie bereits erwähnt dient der Säulenpuffer zum Nachspülen der Säule, nachdem eine Meßprobe die Säule durchlaufen hat. Des weiteren dient der Säulenpuffer aber auch zur Verdünnung der Meßprobe. Zur Auswertung der Meßergebnisse und auch um definierte Versuchsbedingungen zu schaffen, ist in einer vorteilhaften Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Vorrichtung der Säule nachgeschaltet eine Meßvorrichtung zum Bestimmen der Verdünnung der Meßprobe mit dem Säulenpuffer angeordnet. Eine derartige Meßvorrichtung könnte beispielsweise Mittel zur Volumenbestimmung von Flüssigkeiten umfassen. Da in der Regel das Volumen der Meßprobe bekannt ist, reicht es, das Volumen des hinzukommenden Säulenpuffers zu bestimmen oder das Gesamtvolumen aus Meßprobe und Säulenpuffer.

Je nach Art der Meßprobe und des verwendeten Säulenpuffers kann es vorteilhaft sein auch eine Mischvorrichtung zum Herstellen einer homogenen Mischung der behandelten Meßprobe mit dem Säulenpuffer vorzusehen.

Oftmals ist es auch erforderlich, der Meßprobe, gegebenenfalls dem Säulenpuffer und dem Substrat in dem Versuchsgefäß über die Ventil/Pumpen-Anordnung zusätzlich einen Meßpuffer beizumischen, um definierte Versuchsbedingungen herzustellen. In diesem Zusammenhang erweisen sich auch Mittel zum Temperieren des Versuchsgefäßes als vorteilhaft.

Wie bereits im Zusammenhang mit dem erfindungsgemäßen Verfahren angedeutet, ist es vorteilhaft, wenn der Detektor zum Erfassen des Anstiegs der Konzentration eines Spaltprodukts des Substrats ein Fluorometer umfaßt.

In der Diagnostik ist es oftmals erforderlich, Vergleichsmessungen zwischen den Enzymaktivitäten von unbehandeltem Serum und behandeltem Serum durchzuführen. Dazu ist es vorteilhaft, wenn zwischen der Zuführeinrichtung und der Säule der erfin-

dungsgemäßen Vorrichtung mindestens ein umstellbares Ventil angeordnet ist, über das die Meßprobe alternativ über die Säule oder direkt, ohne Durchlaufen der Säule in das Versuchsgefäß leitbar ist. Auf diese Weise können sowohl Messungen an Meßproben durchgeführt werden, denen die entsprechenden Enzym-Inhibitoren entzogen worden sind, als auch Messungen an unbehandelten Meßproben.

In einer vorteilhaften Weiterbildung der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist zusätzlich mindestens ein Ventil vorgesehen, über das zumindest der Säule und der Ventil/Pumpen-Anordnung ein Spülpuffer zum Reinigen zuführbar ist. In vorteilhafter Weise kann so die gesamte Apparatur gereinigt werden.

Schließlich sei noch darauf hingewiesen, daß die erfindungsgemäße Vorrichtung in Verbindung mit einer Rechneinheit automatisch betrieben werden kann, indem die Rechneinheit sowohl das Zuführen der Meßproben und gegebenenfalls des Säulenpuffers steuert, als auch die Bestimmung der Verdünnung der Meßprobe und gegebenenfalls das Mischen und das Befüllen der Versuchsgefäße koordiniert. Außerdem kann die Rechneinheit auch zum Erfassen und Auswerten des Anstiegs der Konzentration eines Spaltprodukts des Substrats pro Zeiteinheit verwendet werden.

Es gibt nun verschiedene Möglichkeiten, die Lehre der vorliegenden Erfindung in vorteilhafter Weise auszugestalten und weiterzubilden. Dazu ist einerseits auf die den Patentansprüchen 1, 7 und 23 nachgeordneten Ansprüche, andererseits auf die nachfolgenden Erläuterung von Ausführungsbeispielen der Erfindung anhand der Abbildungen zu verweisen. In Verbindung mit den Erläuterungen der Ausführungsbeispiele der Erfindung werden auch im allgemeinen bevorzugte Ausgestaltungen und Weiterbildungen der Lehre erläutert.

Abb. 1 zeigt in schematischer Darstellung den sequentiellen Aufbau einer erfindungsgemäßen Vorrichtung.

Die in der Abbildung 1 dargestellte Vorrichtung ermöglicht die vollautomatische und serielle Bestimmung der Enzymaktivitäten von verschiedenen in flüssiger Form vorliegenden Meßproben. Dabei kann es sich um Körperflüssigkeiten aller Art oder auch um homogenisiertes Gewebe handeln.

Die Vorrichtung umfaßt erfindungsgemäß zur Behandlung einer Meßprobe eine Säule 1 mit einem chromatographischen Trägermaterial, wobei das Trägermaterial mit einer Substanz versetzt ist, welche in der zu untersuchenden Meßprobe vorliegende, mit mindestens einem Enzym korrespondierende Enzym-Inhibitoren bindet.

Soll beispielsweise die Aktivität des Enzyms Cathepsin H in einer Meßprobe ermittelt werden, so könnte als chromatographisches Trägermaterial der Säule 1 Sepharose-Gel verwendet werden, welches mit der Substanz Papain präpariert ist. Papain bindet die mit Cathepsin H korrespondierenden Enzym-Inhibitoren.

Dem oberen Ende der Säule 1 ist eine Zuführeinrichtung 2 zugeordnet. In dem hier dargestellten Ausführungsbeispiel handelt es sich um einen Entnahmearm 2, der alternativ auf einen Meßprobenspeicher 3 und ein Reservoir 4 für einen Säulenpuffer zugreifen kann.

Der Säule 1 bzw. dem unteren Ende der Säule 1 nachgeschaltet ist eine Ventil/Pumpen-Anordnung, mit der im dargestellten Ausführungsbeispiel mehrere Versuchsgefäße 5 mit einem Substrat und zumindest einem Teil der Meßprobe befüllbar sind.

Zum Erfassen der Aktivität von Cathepsin H in einer Meßprobe kann als Substrat H-Arg-AMC verwendet werden. Durch Einwirken des Enzyms Cathepsin H wird das Substrat H-Arg-AMC in die Spaltprodukte H-Arg und AMC aufgespalten. Da die Enzymaktivität immer proportional zur Konzentration der Spaltprodukte ist, läßt sich mit dem Anstieg der Konzentration zumindest eines Spaltprodukts des Substrats pro Zeiteinheit während einer Inkubationszeit die Enzymaktivität erfassen. Im Falle des Cathepsin H wird der Anstieg der Konzentration von AMC erfaßt. Dazu wird im Rahmen des hier erörterten Ausführungsbeispiels ein Detektor mit einem Fluorometer verwendet, der in der einzigen Figur nicht näher dargestellt ist.

Im folgenden werden nun die einzelnen Komponenten der in der einzigen Figur dargestellten Vorrichtung näher erläutert.

Wie bereits erwähnt sind verschiedene Meßproben in dem Meßprobenspeicher 3, der beispielsweise durch ein Probenrondell gebildet sein kann, angeordnet. Mit Hilfe des Entnahmearms 2 können die Meßproben nun vollautomatisch entnommen werden und über ein Ventil 6 der Säule 1 zugeleitet werden. Das chromatographische Trägermaterial der Säule 1 ist so präpariert, daß in der Säule 1 ein Überschuß an einer Substanz, in der Regel einem oder mehreren Enzymen, herrscht, die die gewünschten Enzym-Inhibitoren der Meßproben an sich binden können. Der Überschuß an dieser Substanz ist in der Regel so groß, daß die Säule 1 mehrfach verwendbar ist, d.h. für den Durchlauf einer größeren Anzahl von Meßproben geeignet ist. Außerdem ist die Säule 1 austauschbar, so daß sie, nach dem die Substanz in der Säule 1 verbraucht ist, durch eine neue Säule ersetzt werden kann. Die Dimensionierung und konstruktive Ausgestaltung der Säule 1 hängt einerseits von der gewünschten Kapazität der Säule 1 ab und andererseits von dem apparativen Umfeld, in dem die Säule 1 angeordnet werden soll. Die Säule 1 kann also beispielsweise mit einem großen Querschnitt und entsprechend kürzer oder auch

mit einem kleinen Querschnitt und dementsprechend länger ausgebildet sein.

Zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit der Säule 1 sollten in regelmäßigen Abständen Kontrollmessungen an Meßproben mit bekannter Enzymaktivität durchgeführt werden. Auf diese Weise kann einfach festgestellt werden, ob die Enzym-Inhibitoren bindende Substanz der Säule 1 verbraucht ist.

Um nun zu gewährleisten, daß sich die einzelnen Meßproben nicht miteinander vermischen, kann der Säule 1 alternativ zu einer Meßprobe über den Entnahmearm 2 und das Ventil 6 auch ein Säulenpuffer aus dem Reservoir 4 zugeführt werden. Dies erfolgt immer im Anschluß an das Zuführen einer Meßprobe mit Hilfe einer der Säule 1 nachgeschalteten Pumpe 7.

Dieser Pumpe 7 und also der Säule 1 nachgeschaltet ist eine Kontrollvorrichtung 8 in Form eines Photometers, mit der die Reinheit des aus der Säule 1 bzw. der Pumpe 7 austretenden Säulenpuffers überprüft werden kann. Dadurch wird gewährleistet, daß in der Säule ausschließlich Säulenpuffer vorliegt, bevor der Säule 1 eine weitere Meßprobe zugeführt wird.

Durch das Nachspülen der Säule 1 mit Säulenpuffer wird die Meßprobe, die die Säule 1 bereits durchlaufen hat, verdünnt. Der Verdünnungsgrad wird nun in einer der Säule 1 ebenfalls nachgeschalteten Meßvorrichtung 9 im Rahmen einer Volumenmessung bestimmt. Dabei ist das Volumen der Meßprobe bekannt. Erfasst wird lediglich das Volumen des zum Spülen verwendeten Säulenpuffers. Aus dem Gesamtvolumen von Meßprobe und Säulenpuffer kann nun der Verdünnungsgrad berechnet werden.

Der Meßvorrichtung 9 nachgeschaltet ist eine Mischvorrichtung 10, mit Hilfe derer die Mischung aus Meßprobe und Säulenpuffer homogenisiert wird.

Die dabei entstehende homogene Mischung wird einem Ventil 11 zugeführt, über das sowohl diese Mischung als auch das Substrat aus einem Substratbehälter 12 und ein Meßpuffer aus einem entsprechenden Meßpufferbehälter 13 den Versuchsgefäßen 5 zugeleitet werden können. Der Meßpuffer 13 dient dabei zur Herstellung definierter Versuchsbedingungen. Alternativ oder zusätzlich können der Mischung auch weitere Lösungen, beispielsweise eine Titerlösung in Form einer speziellen Inhibitorlösung zur Konzentrationsbestimmung, zugesetzt werden. Hierfür muß die Vorrichtung dann zusätzlich entsprechende Behälter umfassen. Dem Ventil 11 sind in dem hier dargestellten Ausführungsbeispiel noch eine Pumpe 14 und ein weiteres Ventil 15 nachgeschaltet, die der Weiterleitung des nunmehr vorliegenden Gemischs aus Meßprobe, Säulenpuffer, Substrat und Meßpuffer dienen.

Die gesamte hier beschriebene Vorrichtung läßt sich temperieren. In der Regel erfolgt die Behandlung der Meßprobe zum Entziehen der Enzym-Inhibitoren bei einer Temperatur von ca. 4 °C. Insbesondere sind Mittel zur Temperierung der Versuchsgefäße 5 vorgesehen, die in der einzigen Figur allerdings nicht dargestellt sind. Die Versuchsgefäße sollten zumindest während der Inkubationszeit temperierbar sein. Standardgemäß arbeitet man bei Temperaturen von ca. 37 °C. Im Rahmen spezieller Versuchsbedingungen könnte aber auch eine flexible Temperierung sinnvoll sein. Die Inkubationszeit, d.h. die Einwirkzeit der Meßprobe auf die Substrate, hängt von den unterschiedlichen Enzymen und Substraten ab und liegt in der Regel zwischen 5 und 15 Minuten.

An dieser Stelle sei angemerkt, daß es mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung möglich ist, einerseits redundante Messungen durchzuführen, indem in mehreren Versuchsgefäßen die Aktivität ein und desselben Enzyms einer Meßprobe bestimmt wird. Andererseits ist es bei entsprechender Präparation der Säule 1 auch möglich, die Aktivitäten unterschiedlicher Enzyme einer Meß-

probe zu bestimmen, indem unterschiedliche Substrate verwendet werden, man die behandelte Meßprobe also auf unterschiedliche Substrate einwirken läßt. Denkbar wäre schließlich auch noch die Bestimmung der Aktivitäten eines Enzyms auf unterschiedlichen Substraten.

Mit der in der Abbildung 1 dargestellten Vorrichtung können auch Vergleichsmessungen durchgeführt werden, indem Meßproben durch die Säule 1 in die Versuchsgefäße 5 geleitet werden können oder über das Ventil 6, das Ventil 11, die Pumpe 14 und das Ventil 15 direkt in die Versuchsgefäße 5 geleitet werden können. Parallel zu den Messungen an Meßproben, die die Säule 1 durchlaufen haben, können also auch Messungen der Enzymaktivität an Meßproben vorgenommen werden, die die Säule 1 nicht durchlaufen haben. Damit sind sogenannte Vorher-/Nachher-Vergleichsmessungen möglich, nämlich Messungen bei Gegenwart von Enzym-Inhibitoren in der Meßproben und Messungen an von Enzym-Inhibitoren bereinigten Meßproben.

Die in der Abbildung 1 dargestellte Vorrichtung umfaßt schließlich noch ein Ventil 16 über das der gesamten Apparatur ein Spülpuffer 17 zum Reinigen der Apparatur zuführbar ist.

Mit Hilfe einer Rechneinheit 18 lassen sich die einzelnen Komponenten der erfindungsgemäßen Vorrichtung ansteuern, so z.B. die Zuführeinrichtung, so daß der Säule 1 automatisch Meßproben und Säulenpuffer zugeführt werden können. Auch die Auswertung der Meßergebnisse kann mit Hilfe der Rechneinheit 18 erfolgen.

Insgesamt läßt sich mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens und der erfindungsgemäßen Vorrichtung eine rationelle, zumindest weitgehend automatische Meßmethode zur Bestimmung der Enzymaktivitäten von in flüssiger Form vorliegenden Meßproben realisieren.

In Weiterbildung wird ein Verfahren, bzw. eine Vorrichtung zur Bestimmung der Aktivität von Enzymen und/oder zur Bestimmung der Konzentration von Inhibitoren in Flüssigkeiten vorgeschlagen.

Diese Methode kann also additiv oder alternativ zur eingangs genannten Anwendung finden.

In der klinisch-chemischen und mikrobiologischen Diagnostik sowie in der biochemischen Forschung hat die Bestimmung von Enzymaktivitäten einen wichtigen Stellenwert. Zur Durchführung solcher Bestimmungen ist bereits eine große Zahl von Verfahren bekannt und zur routinemäßigen Anwendung gelangt.

Dennoch war es bisher unmöglich, die Aktivitäten verschiedener Enzyme schnell und kostengünstig zu messen, da viele von ihnen im Serum, in anderen Körperflüssigkeiten oder in ihren Ursprungszellen zum Schutz ihrer Umgebung teilweise oder vollständig inhibiert vorliegen, d.h. sie sind dort, wo sie Schaden anrichten können, zum überwiegenden Teil inaktiv.

Kommt es nun zu einer pathologischen Veränderung der Umgebung oder der Ursprungszellen selbst, kann sich das Verhältnis zugunsten der nicht inhibierten, aktiven Form ändern, wobei besonders im Serum ein dadurch entstehender Enzymüberschuß möglichst umgehend durch Inhibitoren reversibel blockiert wird.

Daher ist es mit bisher zur Anwendung gelangten Methoden nur bei außergewöhnlich hohen Enzymkonzentrationen möglich, beispielsweise im Serum die freie Aktivität der nicht inhibierten Enzyme zu messen.

Zur frühzeitigen Diagnose von Erkrankungen kann es jedoch notwendig sein, einen Anstieg der absoluten Enzymaktivität pro Volumeneinheit oder das Verhältnis der Volumenaktivitäten der inhibierten zur freien Enzymfraktion möglichst schnell und sicher zu messen, da die mit herkömmlichen Methoden meßbaren Spitzenaktivitäten der freien Enzymfraktion oft erst in fortgeschrittenem Krankheitsverlauf auftreten.

Auch in der Forschung kann die Kenntnis des aktiven Anteils eines Enzyms am Gesamtpool von Bedeutung sein.

Mittels immunologischer Methoden (ELISA) kann zwar die Konzentration auch des inhihierte Anteils einer Enzymklasse bestimmt werden, jedoch ist ein bedeutender Nachteil der immunologischen Methoden die Unmöglichkeit der Unterscheidung zwischen freiem, also aktivem, und inhihiertem Enzym, da ein solches Verfahren die Summe beider Gruppen sowie auch teilweise oder vollständig funktionsuntüchtige Enzyme erfaßt. Eine Messung von Aktivitäten ist ausgeschlossen.

Mittels bekannter Assays zur Messung von Enzymaktivitäten können die beiden Zustandsformen der Enzyme ebenfalls nicht differenziert werden, da hierbei lediglich die freie Form gemessen werden kann.

Wie kann nun zusätzlich zur freien Aktivität eines Enzyms, das in inhihiertem und freiem Zustand vorliegen kann, die Gesamtaktivität gemessen werden?

Die Lösung ist einfach und kostengünstig:

Der Probe, beispielsweise humanem Serum, werden auf chromatographischem Wege spezifische Inhibitoren, die das gewünschte Enzym in seiner Aktivität hemmen, entzogen. Anschließend kann eine normale Aktivitätsmessung durchgeführt werden.

Wird zusätzlich die Aktivität des Enzyms in der unbehandelten Probe gemessen, kann der Anteil des freien bzw. inhihierten Enzyms an der Gesamtfraktion dieses Enzyms in der Probe bestimmt werden.

Das folgende Beispiel soll der Veranschaulichung des Verfahrens dienen:

An ein Sepharose-Gel als Trägersubstanz wird die Cystein-Proteinase Papain gekoppelt. Das so präparierte Gel wird in eine Chromatographiesäule gepackt. Einer in dieser Säule inhihierten Probe, z.B. Gewebekomogenat aus einem Lungentumor, werden alle Inhibitoren entzogen, die eine höhere Affinität zu

Papain als zu ihren ursprünglichen Enzymen aufweisen. Diese Enzyme können unter anderem die Cathepsine B, H und L sein, wobei Cathepsin H normalerweise nahezu vollständig inhibiert vorliegt und seine Enzymaktivität erst nach Entzug der Inhibitoren (Stefin A, Kininogen und andere) meßbar wird.

Die Messung der Aktivitäten erfolgt nach den bekannten Assays auf flourometrischem Wege unter Verwendung enzymspezifischer Substrate und Inhibitoren.

Dieses Verfahren, das je nach Verwendungszweck mit den unterschiedlichsten Chromatographiematerialien, Enzymen und Inhibitoren durchführbar ist, kann vollständig automatisiert werden und ist damit für den Routineeinsatz im Labor geeignet (siehe hierzu Abbildung 1).

So kann eine große Anzahl an Proben auf einem Probenrondell oder in einem anderen geeigneten Meßprobenspeicher (3) gelagert werden, wovon jeweils ein definiertes Volumen der zu messenden Probe durch eine Entnahmevorrichtung (2) mittels einer nachgeschalteten Pumpe (7) in eine geeignete Chromatographiesäule (1) geführt wird.

Nach einer vorgeschriebenen Inkubationszeit wird die von den gewünschten Inhibitoren gereinigte Probe durch eine auf die gleiche Weise eingeführte definierte Pufferlösung aus einem Säulenpufferreservoir (4) vollständig aus der Säule gespült und gleichzeitig verdünnt.

Eine anschließende Reinheitsmessung (8), beispielsweise auf photometrischem Wege oder durch Messung der Leitfähigkeit, schließt Probenrückstände in der Säule aus und verhindert gleichzeitig einen unnötig hohen Pufferverbrauch.

Mittels einer weiteren Meßeinrichtung (9) kann das aus der Säule gespülte Gesamtvolumen bestimmt werden.

Um eine homogene Mischung des Probe-Puffergemischs nach dem Ausspülen aus der Säule zu erreichen, ist dieser eine Mischvorrichtung (10) nachgeschaltet.

Mittel einer weiteren Pumpe kann über ein Ventil, das wie alle anderen Funktionseinheiten des Geräts zentral von einem Rechner (18) angesteuert wird, in der vorgeschriebenen Reihenfolge Meßpuffer, Substrat, eventuell Inhibitoren und die in einem

bekannten Verhältnis durch die anfangs verwendete Pufferlösung verdünnte Probe in eine flourometrische Meßeinheit (5) geleitet werden.

Der Rechner kann nun aus den Meßdaten auf einfache Weise die in der Originalprobe vorliegende Aktivität des gewünschten Enzyms pro Volumeneinheit oder, bei Kenntnis der Proteinkonzentration in diesem Volumen, die Aktivität pro Masseinheit errechnen.

Zum Vergleich der solchermaßen gemessenen Enzymaktivität mit der Aktivität in der unbehandelten Probe kann diese unter Umgehung der Chromatographiesäule auch direkt zur Messung gebracht werden.

Nach oder bereits während dem Meßvorgang kann mit der automatisch gesteuerten Spülung der Vorrichtung begonnen werden, um Rückstände der Probe vollständig zu entfernen.

Weitere Erläuterungen zu Abbildung 1 finden sich in der Stammanmeldung.

Um spezielle Aufgaben mit der beschriebenen Vorrichtung optimal lösen zu können, kann die Anordnung einiger Einheiten, insbesondere der Ventile, von der in Abbildung 1 gezeigten abweichen.

Vorteilhaft ist es, wenn zur Steigerung der Effizienz der Vorrichtung mehrere Säulen parallel oder in Reihe geschaltet sind. Auch mehrere parallele flourometrische Messungen der Aktivitäten unterschiedlicher Enzyme aus derselben Probe tragen zu einer höheren Leistungsstärke der Vorrichtung bei.

Anstatt flourometrischer Messung der Aktivitäten spezifischer Enzyme kann auch, je nach Bedarf und verwendetem Meß-Assay, ein anderes Meßsystem, z.B. ein photometrisches, verwendet werden.

Als Besonderheit können unterschiedlich präparierte, selbstverständlich mehrfach verwendbare Säulen verwendet werden, so beispielsweise mit unterschiedlichen Enzymen oder großtech-

nisch hergestellten Enzymfragmenten sowie auch mit Inhibitoren bestückte Chromatographie-Materialien.

Dank dieser zahlreichen Möglichkeiten können neben Enzymen auch, je nach Säule, Inhibitoren gereinigt werden.

Wird eine mit Enzymen präparierte Säule verwendet, können die den Proben entzogenen Inhibitoren nach dem Erreichen der Kapazität der Säule durch ein einfaches chemisches Verfahren von den Enzymen getrennt und der weiteren Verwendung zugeführt werden. Auf diese Weise könnten auch bislang unbekannte Inhibitoren angereichert und klassifiziert werden.

Wird dagegen eine mit Inhibitoren präparierte Säule verwendet, können der Probe selektiv Enzyme entzogen und klassifiziert werden, die bei diesem Vorgehen anstelle der oben beschriebenen Enzyme (z.B. Cathepsin H) aus der Säule gepülten Inhibitoren (z.B. Kininogen) werden in spezifischen Assays auf ihre in der jeweiligen Probe vorliegende Konzentration und Inhibitoraktivität hin untersucht.

Die Abbildungen erläutern die Weiterbildung.

Die Effizienz der oben beschriebenen Papainsäule (Sephargel als chromatographisches Trägermaterial, Papain als daran gekoppeltes Enzym) wird im Zusammenhang mit der Untersuchung der Proteinase Cathepsin B, H und L durch die folgenden Messungen beispielhaft belegt:

1. Gemessen wurden die Aktivitäten ($\mu\text{U}/\text{mg}$ Protein) der Cathepsine B, H und L in Lungengewebehomogenaten von Tumorpatienten vor und nach einem Entzug der korrespondierenden Inhibitoren durch ein mit Papain präpariertes Sephargel. Die Inkubationszeit der Proben in der Säule wurden auf 15 Minuten festgelegt.

Abbildung 2 zeigt, daß die Aktivität sowohl im unbefallenen als auch im tumorbefallenen Lungengewebe nach einem Entzug der Inhibitoren auf den Säulen im Median wesentlich höher als in der unbehandelten Probe liegt.

In dieser Grafik wurde für den Vorher-/Nachher-Vergleich jeweils dasselbe Probenkollektiv verwendet. Der Anstieg der Aktivitäten ist nur durch einen Entzug der Inhibitoren zu erklären und literaturkonform.

2. Abbildung 3 zeigt, daß vor einem Entzug der Inhibitoren auf der Papainsäule die Proteinmenge (mg/ml) im Median wesentlich höher liegt als nach einem Entzug, was nur durch einen tatsächlich stattfindenden Entzug der Inhibitoren zu erklären ist.

3. Als Beispiel für den zeitlichen Verlauf der Inhibitorabgabe an das auf die Säule gebundene Papain wurde ein Probenpaar zufällig ausgewählt und die Aktivitäten nach jeweils unterschiedlich langen Inkubationszeiten auf der Papainsäule bestimmt.

Aus Abbildung 4 ist ersichtlich, daß die Aktivität von Cathepsin B vom Zeitpunkt 0 an rapide steigt, um nach etwa 15 Minuten in ein Plateau überzugehen. Der Zeitpunkt 0 ist identisch mit der Messung vor einem Inhibitorentzug.

Auch Abbildungen 5 und 6 zeigen einen starken Anstieg der Aktivitäten nach kurzer Inkubationszeit. Die in Abbildung 6 genannte Restaktivität aus der Aktivitätsmessung von Cathepsin L ist die Aktivität eines noch nicht näher klassifizierten Enzyms.

4. Abbildung 7 stellt den Verlauf der Abnahme des Proteingehalts der unter 3. beschriebenen Probe dar. Schon nach kurzer Zeit hat die Proteinmenge ihr Minimum erreicht und geht im zeitlichen Verlauf in ein Plateau über; d.h. die Inhibitoren werden dank des Überschusses an Papain in der Säule schnell und sicher gebunden.

5. Aus der in Abbildung 8 gezeigten Überlebenskurve (Kaplan-Meier-Kurve) ist ersichtlich, daß diejenigen Patienten, deren Cathepsin H-Aktivität im Tumorgewebe über einem Schwellenwert von 533uEU/mg liegt, eine wesentlich ungünstigere

Prognose bezüglich der Überlebenszeit haben als diejenigen, deren Wert unter diesem Schwellenwert liegt. Die Werte für diese wie auch die oben genannten Abbildungen stammen aus Originalmessungen, die mittels einer Papainsäule durchgeführt wurden.

Aus den oben genannten Ausführungen ist -beispielsweise- zu folgern:

- In vielen Körperflüssigkeiten, z.B. Serum, Urin oder Liquor, wie auch in Gewebehomogenaten, Bakteriensuspensionen und anderen Flüssigkeiten liegen in ihrer Aktivität durch spezifische Inhibitoren blockierte Enzyme vor. Die Aktivität dieser Enzyme konnte bisher nicht oder nur bei einem Vorliegen von Spitzenwerten gemessen werden.
- Immunologische Verfahren wie beispielsweise das relativ teure ELISA-Prinzip können nur Gesamtkonzentrationen, nicht jedoch Aktivitäten von intakten und somit funktionstüchtigen Enzymen bestimmen.
- Durch die Verwendung einer entsprechend präparierten chromatographischen Säule ist es möglich geworden, der Probe spezifische Inhibitoren zu entziehen und somit Gesamt- und Teilaktivitäten eines oder mehrerer Enzyme zu messen.
- Ein Nebeneffekt dieser Methode ist die Reinigung und Anreicherung spezifischer Inhibitoren auf der Säule. Diese können anschließend zu Klassifizierungszwecken von dem chromatographischen Material getrennt werden.
- Ebenso ist es möglich, statt Enzyme oder großtechnisch hergestellte Enzymfragmente Inhibitoren, die inzwischen ebenfalls großtechnisch hergestellt werden können, an das Trägermaterial zu binden und somit unbekannte Enzyme zu klassifizieren sowie die jeweils in der Probe vorhandene Inhibitorkonzentration und Inhibitoraktivität zu bestimmen.

- Dank einer Automatisierung kann die oben beschriebene oder eine den Bedürfnissen entsprechende, modifizierte Vorrichtung im täglichen Routinebetrieb des klinisch-chemischen Labors, in der mikrobiologischen Diagnostik oder auch in der biochemischen Forschung eingesetzt werden.
- Dank der Mehrfachverwendbarkeit der Chromatographiesäulen und ihren niedrigen Herstellungskosten ist es möglich, in kurzer Zeit eine große Anzahl von Proben sehr kostengünstig zu untersuchen.
- Durch die Einführung einer entsprechenden Vorrichtung wird ein bisher mangels geeigneter Technik unbearbeitetes Aufgaben- und Forschungsgebiet erschlossen.
- Dank des beschriebenen Verfahren und der Vorrichtung ist es möglich, eine Prognose über den Krankheitsverlauf und die Überlebenszeit der Patienten zu erstellen und die Patienten somit einer ihren speziellen Bedürfnissen angepasste Therapie zuzuführen. Es wird Aufgabe der Forschung sein, mittels des Verfahrens und der Vorrichtung neue, aussagefähige Tumormarker und Verlaufsparemeter herauszuarbeiten.
- Auch für die Bakteriologie und Mikrobiologie kann das Verfahren und die Vorrichtung von Bedeutung sein, da die biochemische Klassifikation von beispielsweise Bakterien von beträchtlicher Bedeutung für die Diagnostik ist.

Da die oben beschriebene Vorrichtung nur in gewissem Umfang transportabel ist und sich zur Durchführung eines preisgünstigen Schnelltests außerhalb des Labors wenig eignet, ist, aufbauend auf dem oben beschriebenen und in Abbildung 1 gezeigten Verfahren, die nachfolgend beschriebene Vorrichtung zur Durchführung eines Schnelltests von Vorteil.

Abbildung 9 erläutert die Weiterbildung.

In einer speziellen Spritze (1), die schematisch in den Zustandsformen A, B und C dargestellt ist, befindet sich im unteren Teil zwischen zwei Mikrofiltern (3 sowie Bestandteil von 5), ein chromatographisches Material (4), an das analog zum oben beschriebenen Verfahren Enzyme, Inhibitoren oder großtechnisch hergestellte Fragmente gekoppelt sind.

Im Zustand vor dem Gebrauch (A) befindet sich im selben Raum wie das chromatographische Material sowie über diesem, jedoch unterhalb des Spritzenstempels (2) im flüssigkeitsgefüllten Raum (6) eine den Erfordernissen entsprechende Flüssigkeit, beispielsweise eine Spülpufferlösung.

Um den Reaktionszustand (B) zu erreichen, wird eine Probe, beispielsweise Blut, Serum, Urin, Liquor oder eine andere Flüssigkeit, durch einen mittels des Spritzenstempels (2) hergestellten Unterdruck durch die Spritzenöffnung (5), die mit einem Mikrofilter versehen ist, in den Raum, in dem sich das chromatographische Material befindet, eingezogen. Daran schließt sich eventuell eine definierte Inkubationszeit an. Im Reaktionszustand werden der Probe je nach chromatographischem Material die Inhibitoren, z.B. Kininogene bei Verwendung eines mit Papain bestückten Sepharose-Gels, oder die Enzyme entzogen.

Danach wird die so behandelte Probe mittels Druck auf den Spritzenstempel mitsamt der sich in Zustand A über dem Filter (3) und gleichzeitig unter dem Spritzenstempel (2) befindenden Flüssigkeit aus der Spritze durch die Spritzenöffnung (5) hindurch in ein Reaktionsbehältnis (7) verbracht (C).

In dem Reaktionsbehältnis kann sich ein spezifisches Substrat befinden, das beispielsweise durch solchermäßen von ihren Inhibitoren befreite Enzyme spezifisch gespalten wird und auf diese Weise, ähnlich einem Indikator, die Farbe verändert.

Nach einer definierten Zeit kann, beispielsweise anhand der Farbveränderung im Reaktionsbehältnis, das Ergebnis des Schnelltests abgelesen werden.

Dank dieses Verfahrens ist es möglich, auch ohne ein aufwendiges Laborgerät, welchem die in Abbildung 1 beschriebene Vorrichtung zugrundeliegt, eine entsprechende Diagnostik und Prognostik, wenn auch nicht mit den Möglichkeiten und der Präzision, die ein solches Laborgerät bietet, durchzuführen. Zur Anwendung gelangen könnte ein solcher Schnelltest beispielsweise in der präklinischen wie auch klinischen Notfalldiagnostik sowie in der allgemeinärztlichen Praxis.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung der Aktivität von Enzymen in Flüssigkeiten, bei dem einer Meßprobe die mit mindestens einem Enzym korrespondierenden Enzym-Inhibitoren entzogen werden und bei dem die so behandelte Meßprobe mit einem Substrat versetzt wird, wobei das Substrat durch das Einwirken des Enzyms in Spaltprodukte aufgespalten wird und der Anstieg der Konzentration zumindest eines Spaltprodukts des Substrats pro Zeiteinheit während einer Inkubationszeit erfaßt wird, dadurch gekennzeichnet, daß die Enzym-Inhibitoren der Meßprobe auf chromatographischem Wege entzogen werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Meßprobe durch eine Säule (1) mit einem chromatographischen Trägermaterial geleitet wird, wobei das Trägermaterial mit einer die Enzym-Inhibitoren bindenden Substanz versetzt ist.

3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die behandelte Meßprobe mit einem geeigneten Säulenpuffer verdünnt wird.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die behandelte Meßprobe zur Herstellung definierter Versuchsbedingungen mit einem geeigneten Meßpuffer versetzt wird.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Substrat zumindest während der Inkubationszeit temperiert wird.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Anstieg der Konzentration eines der Spaltprodukte des Substrats flourometrisch bestimmt wird.

7. Vorrichtung zur Bestimmung der Aktivität von Enzymen in Flüssigkeiten, insbesondere mit einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, 23 bis 27,

dadurch gekennzeichnet, daß zur Behandlung einer Meßprobe eine Säule (1) mit einem chromatographischen Trägermaterial vorgesehen ist, wobei das Trägermaterial mit einer Substanz versetzt ist, welche in der Meßprobe vorliegende, mit mindestens einem Enzym korrespondierende Enzym-Inhibitoren bindet, daß dem Ende der Säule (1) nachgeschaltet eine Ventil-/Pumpen-Anordnung (7, 11, 14, 15) angeordnet ist, mit der mindestens ein Versuchsgefäß (5) mit einem Substrat und zumindest einem Teil der Meßprobe befüllbar ist, und daß ein Detektor zum Erfassen des Anstiegs der Konzentration zumindest eines Spaltprodukts pro Zeiteinheit vorgesehen ist.

8. Vorrichtung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Säule (1) mehrfach verwendbar ist, indem ein der Kapazität der Säule (1) entsprechender Überschuß an der Substanz vorhanden ist.

9. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Säule (1) austauschbar ist.

10. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 7 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Zuführeinrichtung (2) alternativ Zugriff auf einen Meßprobenspeicher (3) oder ein Reservoir (4) eines Säulenpuffers hat.

11. Vorrichtung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß der Säule (1) nachgeschaltet eine Kontrollvorrichtung (8) zum Überprüfen der Reinheit des aus der Säule (1) austretenden Säulenpuffers vorgesehen ist.

12. Vorrichtung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Kontrollvorrichtung (8) photometrisch arbeitet.

13. Vorrichtung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Kontrollvorrichtung Mittel zur Messung der Leitfähigkeit von Flüssigkeiten umfaßt.

14. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 10 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß der Säule (1) nachgeschaltet eine Meßvorrichtung (9) zum Bestimmen der Verdünnung der Meßprobe mit Säulenpuffer angeordnet ist.

15. Vorrichtung nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Meßvorrichtung (9) Mittel zur Volumenbestimmung von Flüssigkeiten umfaßt.

16. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 10 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß der Säule (1) nachgeschaltet eine Mischvorrichtung (10) zum Herstellen einer homogenen Mischung der behandelten Meßprobe mit Säulenpuffer angeordnet ist.

17. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 7 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß der Meßprobe, ggf. dem Säulenpuffer und dem Substrat in dem Versuchsgefäß (5) über die Ventil-/Pumpen-Anordnung (11, 14, 15) ein Meßpuffer zum Herstellen definierter Versuchsbedingungen beimischbar ist.

18. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 7 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß der Detektor ein Fluorometer umfaßt.

19. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 7 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß Mittel zum Temperieren des Versuchsgefäßes (5) vorgesehen sind.

20. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 7 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen der Zufuhreinrichtung (2) und der Säule (1) mindestens ein umstellbares Ventil (6) angeordnet ist, über das die Meßprobe alternativ über die Säule (1) oder direkt, ohne Durchlaufen der Säule (1) in das Versuchsgefäß (5) leitbar ist.

21. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 7 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein Ventil (16) vorgesehen ist, über das zumindest der Säule (1) und der Ventil-/Pumpen-Anordnung ein Spulpuffer zum Reinigen zuführbar ist.

22. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 7 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß eine Rechneinheit (18) vorgesehen ist zum automatischen Betreiben und Steuern zumindest der Zuführung der Meßproben und ggf. des Säulenpuffers, ggf. der Bestimmung der Verdünnung der Meßprobe und ggf. des Mischens, des Befüllens der Versuchsgefäße (5) und des Erfassens und Auswertens des Anstiegs der Konzentration zumindest eines Spaltprodukts des Substrats pro Zeiteinheit.

23. Verfahren zur Bestimmung der Enzyminhibitoren in Flüssigkeiten, bei dem einer Meßprobe die mit mindestens einem Enzyminhibitor korrespondierenden Enzyme entzogen werden und bei dem die so behandelte Meßprobe mittels eines spezifischen Meß-Assays auf die vorhandene Konzentration und/oder Aktivität der spezifischen Inhibitoren untersucht wird, wobei die Enzyme der Meßprobe auf chromatographischem Wege entzogen werden, insbesondere nach einem der Ansprüche 1 bis 6.

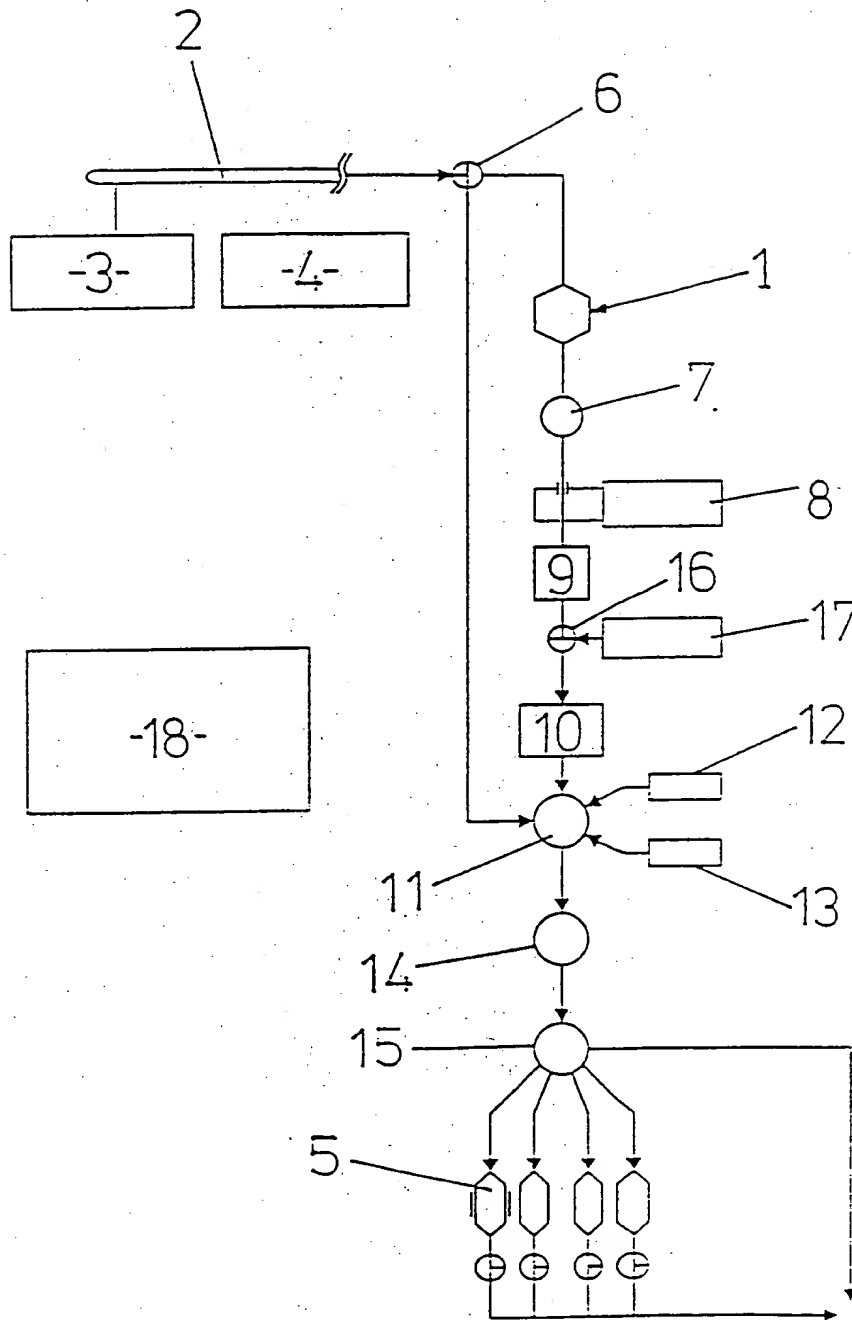
24. Verfahren nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß die Meßprobe durch eine Säule (1) mit einem chromatographischen Trägermaterial geleitet wird, wobei das Trägermaterial mit einer die Enzyme bindenden Substanz versetzt ist.

25. Verfahren nach Anspruch 23 oder 24, dadurch gekennzeichnet, daß die behandelte Meßprobe mit einem geeigneten Säulenpuffer definiert verdünnt wird.

26. Verfahren nach einem der Ansprüche 23 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß die behandelte Meßprobe zur Herstellung definierter Versuchsbedingungen mit einem geeigneten Meßpuffer versetzt wird.

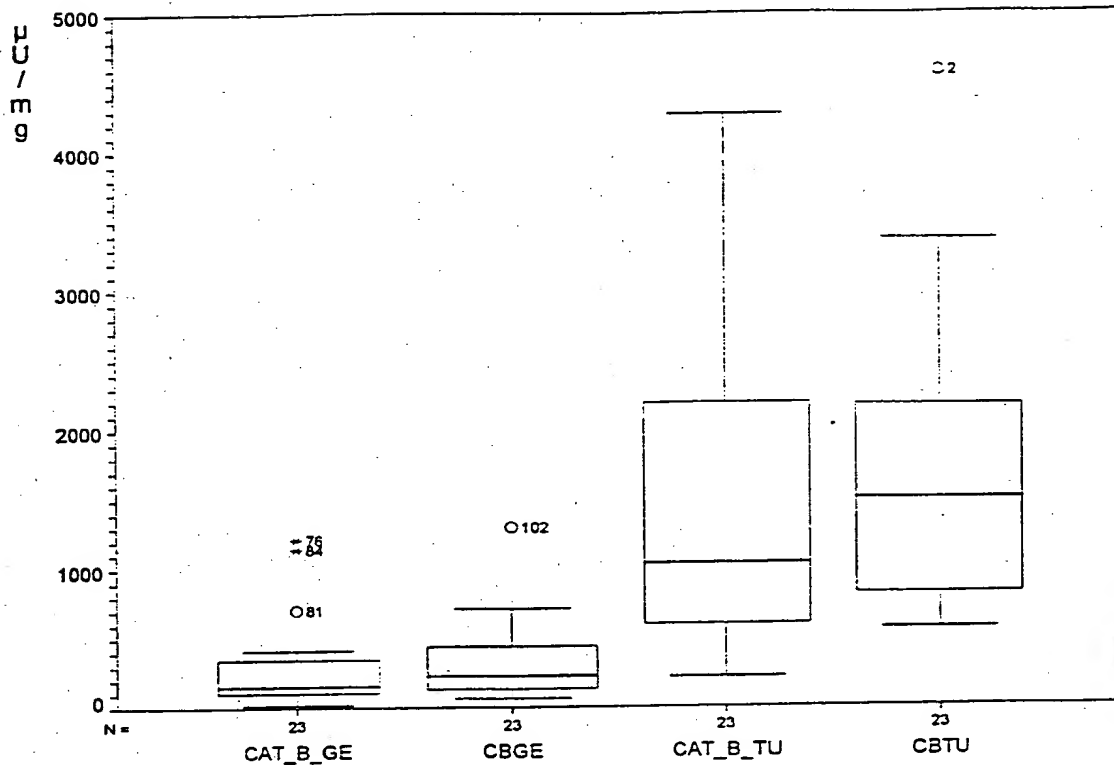
27. Verfahren nach einem der Ansprüche 23 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß die zur Messung der Inhibitorenkonzentration und/oder Inhibitoraktivität notwendigen, zum Meß-Assay gehörenden Substanzen zumindest während der Inkubationszeit temperiert werden.

Abb.1



2/9

Abb.2: Cathepsin B-Aktivität



LEGENDE: CAT_B_GE: Cathepsin B-Aktivität des unbeeinträchtigten Lungengewebes vor dem Inhibitorzug.

CAT_B_TU: Cathepsin B-Aktivität des tumorbeeinträchtigten Lungengewebes vor dem Inhibitorzug.

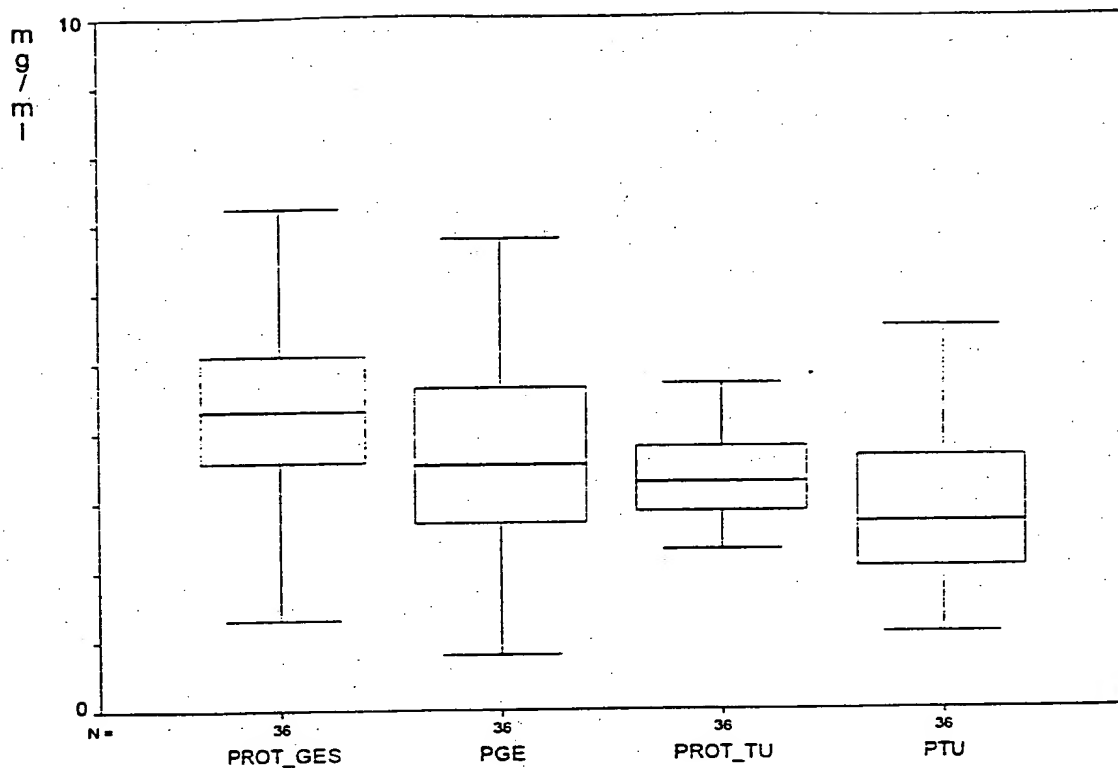
CBGE: Cathepsin B-Aktivität des unbeeinträchtigten Lungengewebes nach dem Inhibitorzug.

CBTU: Cathepsin B-Aktivität des tumorbeeinträchtigten Lungengewebes nach dem Inhibitorzug.

N: Fallzahl.

Y-Achse: Aktivität in pU/mg Protein.

Abb.3: Proteinmenge



LEGENDE: PROT_GES: Proteinmenge des unbefallenen Lungengewebes vor dem Inhibitorentzug.

PROT_TU: Proteinmenge des tumorbefallenen Lungengewebes vor dem Inhibitorentzug.

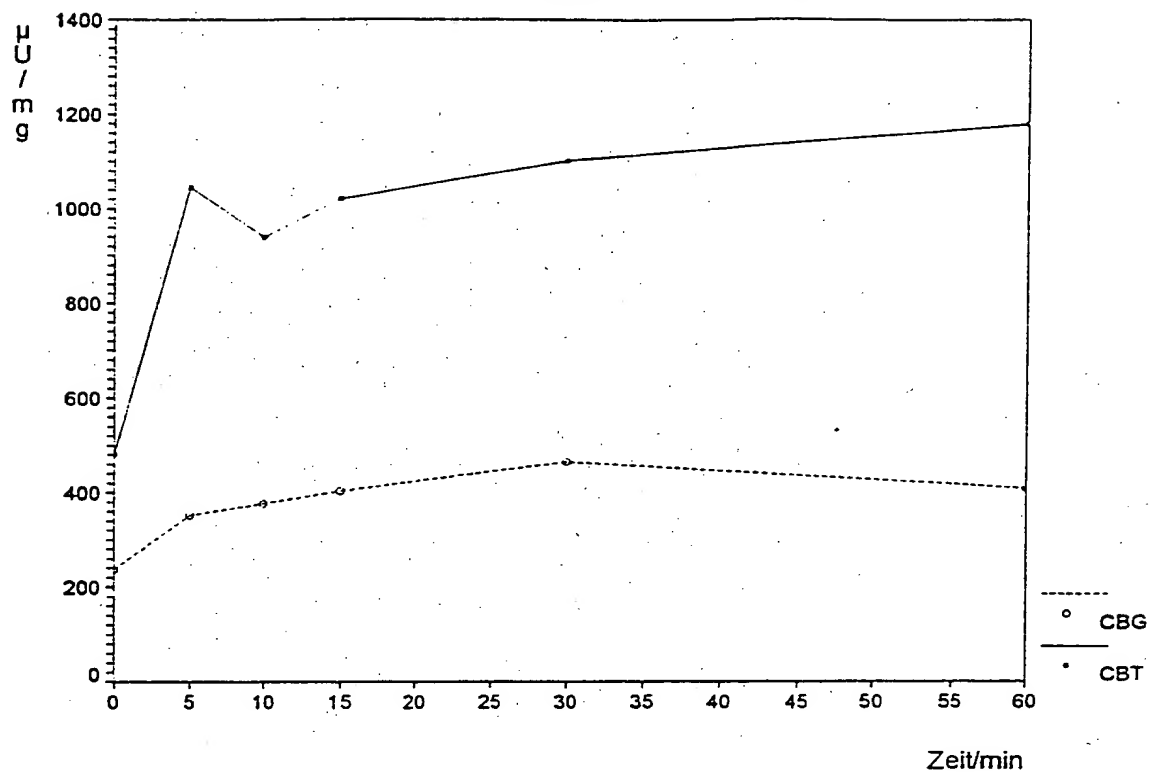
PGE: Proteinmenge des unbefallenen Lungengewebes nach dem Inhibitorentzug.

PTU: Proteinmenge des tumorbefallenen Lungengewebes nach dem Inhibitorentzug.

N: Fallzahl.

Y-Achse: Proteinmenge in mg/ml.

Abb.4: Cathepsin B-Aktivität



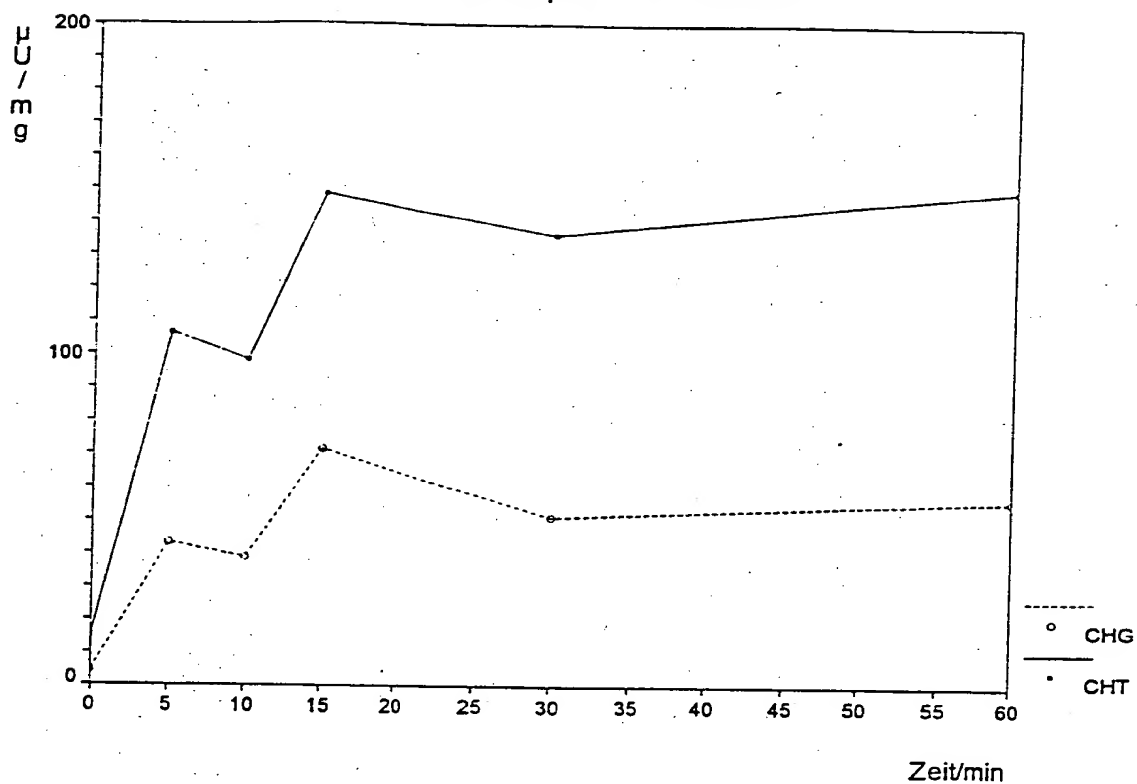
LEGENDE: CBG: Cathepsin B-Aktivität des unbefallenen Lungengewebes vor bzw. nach dem Inhibitorentzug.

CBT: Cathepsin B-Aktivität des tumorbefallenen Lungengewebes vor bzw. nach dem Inhibitorentzug.

X-Achse: Zeitlicher Verlauf in Minuten; 0 min entspricht dem Zustand vor, die weiteren Punkte entsprechen dem Zustand nach einem Inhibitorentzug.

Y-Achse: Aktivität in $\mu\text{U}/\text{mg}$ Protein.

Abb.5: Cathepsin H-Aktivität



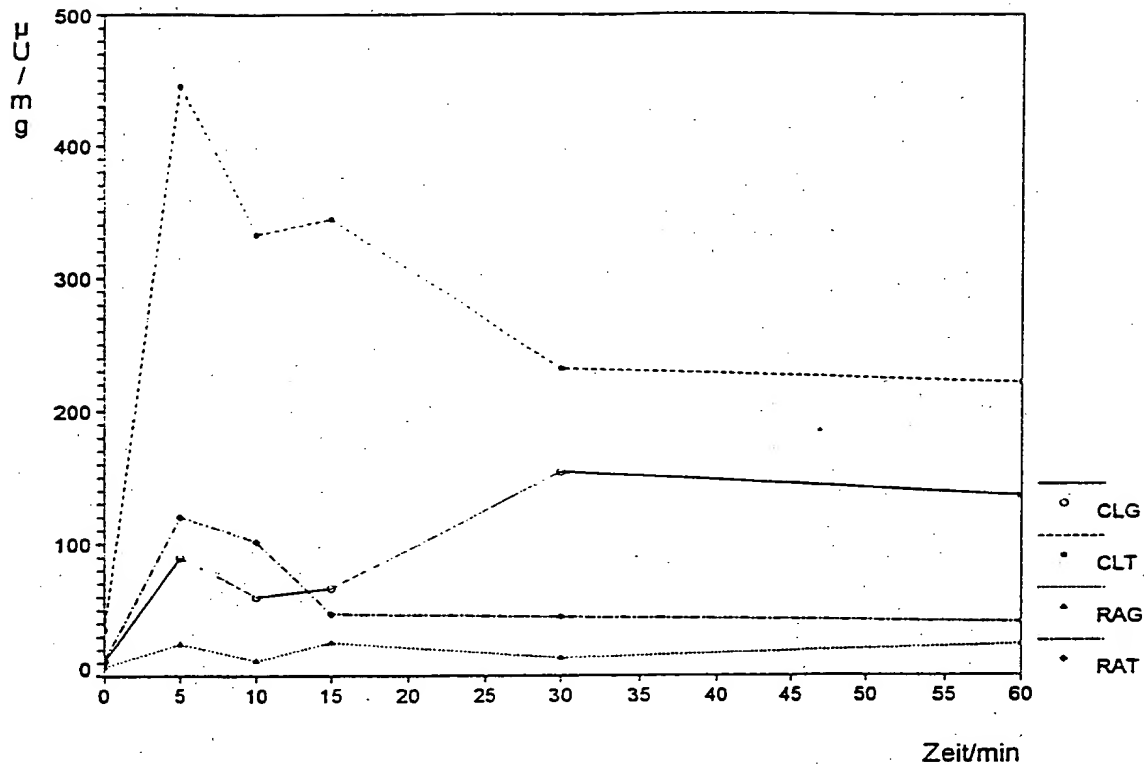
LEGENDE: CHG: Cathepsin H-Aktivität des unbefallenen Lungengewebes vor bzw. nach dem Inhibitorentzug.

CHT: Cathepsin H-Aktivität des tumorbefallenen Lungengewebes vor bzw. nach dem Inhibitorentzug.

X-Achse: Zeitlicher Verlauf in Minuten; 0 min entspricht dem Zustand vor, die weiteren Punkte entsprechen dem Zustand nach einem Inhibitorentzug.

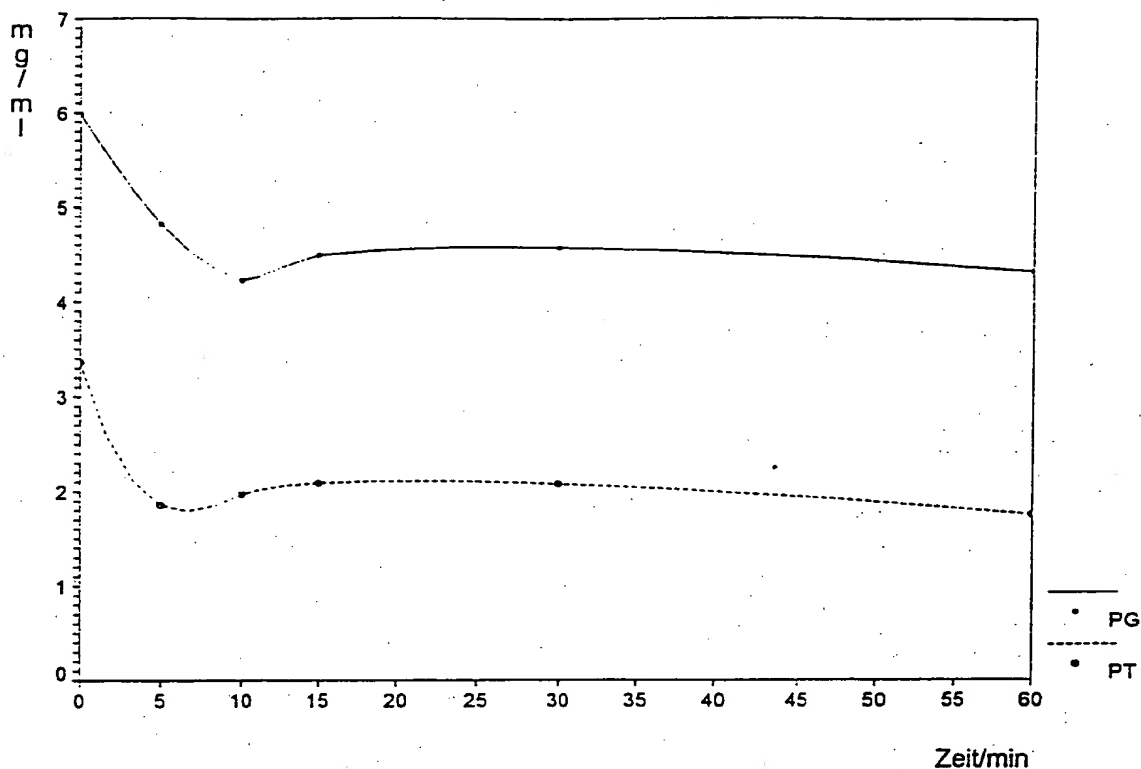
Y-Achse: Aktivität in µU/mg Protein.

Abb.6: Cathepsin L-Aktivität



- LEGENDE: CLG: Cathepsin L-Aktivität des unbefallenen Lungengewebes vor bzw. nach dem Inhibitorentzug.
- CLT: Cathepsin L-Aktivität des tumorbefallenen Lungengewebes vor bzw. nach dem Inhibitorentzug.
- RAG: Restaktivität aus der Messung von CLG nach einer Zugabe von spezifischem Inhibitor für Cystein-Proteinasen (E64).
- RAT: Restaktivität aus der Messung von CLT nach einer Zugabe von E64.
- X-Achse: Zeitlicher Verlauf in Minuten; 0 min entspricht dem Zustand vor, die weiteren Punkte entsprechen dem Zustand nach einem Inhibitorentzug.
- Y-Achse: Aktivität in µU/mg Protein.

Abb.7: Proteinmenge



LEGENDE: PG: Proteinmenge des unbefallenen Lungengewebes vor bzw. nach dem Inhibitorentzug.

PT: Proteinmenge des tumorbefallenen Lungengewebes vor bzw. nach dem Inhibitorentzug.

X-Achse: Zeitlicher Verlauf in Minuten; 0 min entspricht dem Zustand vor, die weiteren Punkte entsprechen dem Zustand nach einem Inhibitorentzug.

Y-Achse: Proteinmenge in mg/ml.

Abb.8: Kaplan-Meier-Kurve (Überlebenskurve)

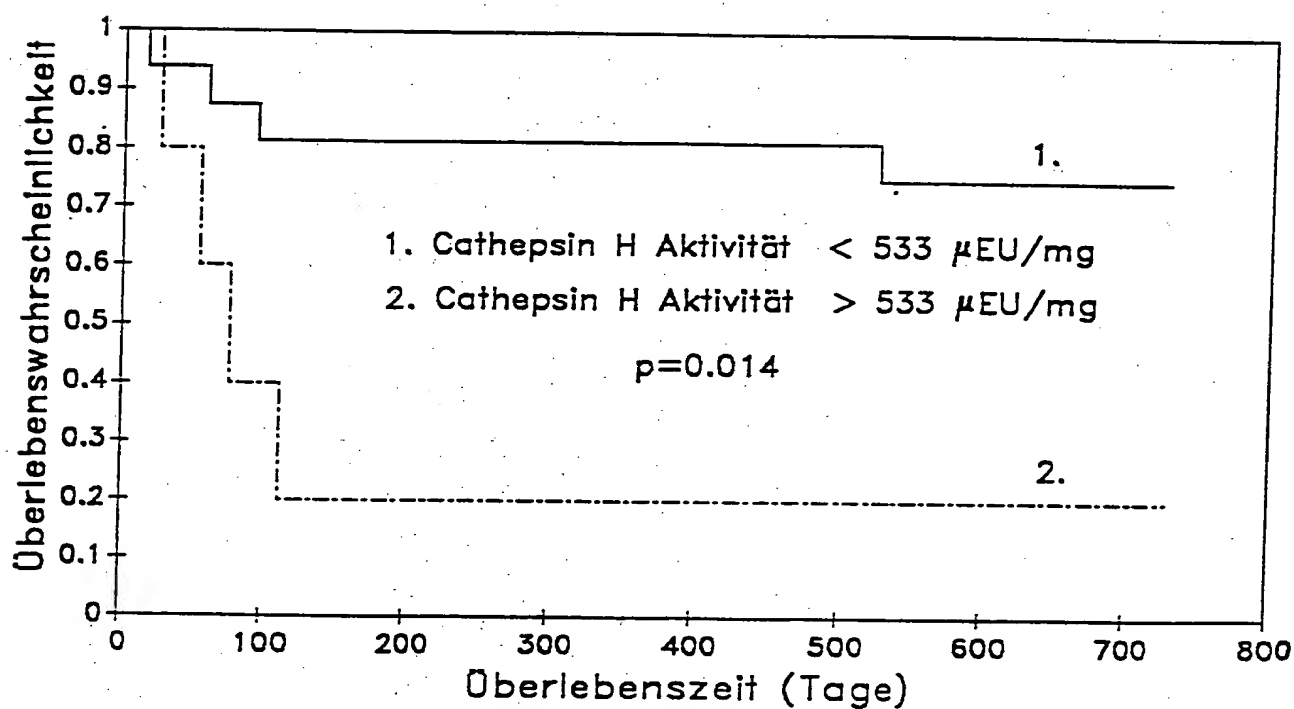
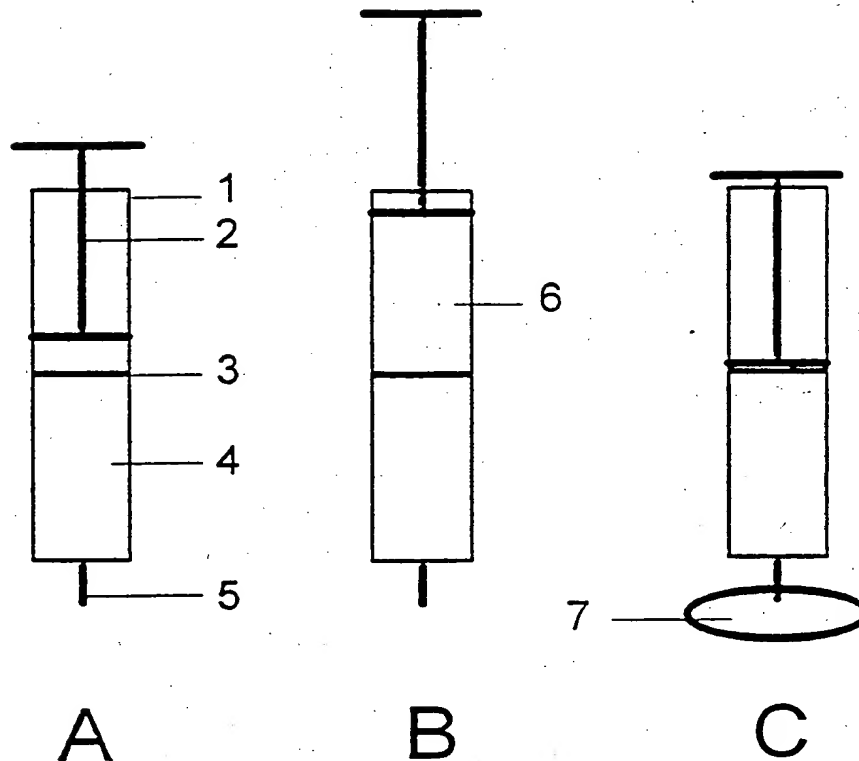


Abb.9: Schnelltest-Vorrichtung



LEGENDE:

- A: Zustand vor dem Gebrauch
 B: Zustand nach dem Einziehen der Probe
 C: Zustand nach dem Einbringen der Probe in ein Reaktionsbehältnis.

- 1: Spritze
 2: Spritzenstempel
 3: Mikrofilter
 4: Chromatographisches Trägermaterial mit an dieses gebundenen Enzymen
 5: Öffnung der Spritze zum Einziehen und Ausbringen der Probe, mit Mikrofilter versehen
 6: Flüssigkeitsgefüllter Raum
 7: Reaktionsbehältnis

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 96/01087

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12Q1/00 C12M1/36

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12Q C12M

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP,A,0 329 190 (SHOWA DENKO KABUSHIKI KAISHA) 23 August 1989 ---	
A	EP,A,0 335 354 (BIOCONTROL SYSTEMS, INCORPORATED) 4 October 1989 ---	
A	EP,A,0 019 638 (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO. LTD.) 10 December 1980 ---	
A	GB,A,2 213 262 (MERCK & CO. INC.) 9 August 1989 -----	

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- * "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- * "E" earlier document but published on or after the international filing date
- * "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- * "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- * "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- * "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- * "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- * "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- * "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 November 1996

Date of mailing of the international search report

26 -11- 1996

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Griffith, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 96/01087

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-329190	23-08-89	JP-A- 2186997	23-07-90
		JP-A- 1296997	30-11-89
		JP-B- 7028756	05-04-95
		JP-A- 2163097	22-06-90
		DE-D- 68924186	19-10-95
		DE-T- 68924186	02-05-96

EP-A-335354	04-10-89	US-A- 5206139	27-04-93
		JP-A- 2023898	26-01-90
		US-A- 5354655	11-10-94

EP-A-0019638	10-12-80	JP-C- 1277911	16-08-85
		JP-A- 55037152	15-03-80
		JP-B- 60000029	05-01-85
		WO-A- 8000574	03-04-80
		US-A- 4331767	25-05-82

GB-A-2213262	09-08-89	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 96/01087

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12Q1/00 C12M1/36

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK 1

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12Q C12M

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehorende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP,A,0 329 190 (SHOWA DENKO KABUSHIKI KAISHA) 23.August 1989	
A	EP,A,0 335 354 (BIOCONTROL SYSTEMS, INCORPORATED) 4.Oktober 1989	
A	EP,A,0 019 638 (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO. LTD.) 10.Dezember 1980	
A	GB,A,2 213 262 (MERCK & CO. INC.) 9.August 1989	

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

11.November 1996

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

26-11-1996

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Griffith, G

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 96/01087

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A-329190	23-08-89	JP-A- 2186997	23-07-90
		JP-A- 1296997	30-11-89
		JP-B- 7028756	05-04-95
		JP-A- 2163097	22-06-90
		DE-D- 68924186	19-10-95
		DE-T- 68924186	02-05-96

EP-A-335354	04-10-89	US-A- 5206139	27-04-93
		JP-A- 2023898	26-01-90
		US-A- 5354655	11-10-94

EP-A-0019638	10-12-80	JP-C- 1277911	16-08-85
		JP-A- 55037152	15-03-80
		JP-B- 60000029	05-01-85
		WO-A- 8000574	03-04-80
		US-A- 4331767	25-05-82

GB-A-2213262	09-08-89	KEINE	

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5.
Internationales Aktenzeichen PCT/DE 96/01087	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 19/06/1996	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 20/06/1995
Anmelder SCHUMACHER, Johannes		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 2 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).
2. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).
3. ☐ In der internationalen Anmeldung ist ein Protokoll einer Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz offenbart; die internationale Recherche wurde auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt,
 - ☐ das zusammen mit der internationalen Anmeldung eingereicht wurde.
 - ☐ das vom Anmelder getrennt von der internationalen Anmeldung vorgelegt wurde,
 - ☐ dem jedoch keine Erklärung beigelegt war, daß der Inhalt des Protokolls nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung in der eingereichten Fassung hinausgeht.
 - ☐ das von der Internationalen Recherchenbehörde in die ordnungsgemäße Form übertragen wurde.
4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung
 - ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
 - ☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt.
5. Hinsichtlich der Zusammenfassung
 - ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
 - ☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der Feld III angegebenen Fassung von dieser Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Internationalen Recherchenbehörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.
6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen:
Abb. Nr. 1
 - ☒ wie vom Anmelder vorgeschlagen
 - ☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.
 - ☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☐ keine der Abb.

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12Q1/00 C12M1/36

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C12Q C12M

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP,A,0 329 190 (SHOWA DENKO KABUSHIKI KAISHA) 23.August 1989 ---	
A	EP,A,0 335 354 (BIOCONTROL SYSTEMS, INCORPORATED) 4.Oktober 1989 ---	
A	EP,A,0 019 638 (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO. LTD.) 10.Dezember 1980 ---	
A	GB,A,2 213 262 (MERCK & CO. INC.) 9.August 1989 -----	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

11.November 1996

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

26 -11- 1996

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Griffith, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 96/01087

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-329190	23-08-89	JP-A- 2186997	23-07-90
		JP-A- 1296997	30-11-89
		JP-B- 7028756	05-04-95
		JP-A- 2163097	22-06-90
		DE-D- 68924186	19-10-95
		DE-T- 68924186	02-05-96

EP-A-335354	04-10-89	US-A- 5206139	27-04-93
		JP-A- 2023898	26-01-90
		US-A- 5354655	11-10-94

EP-A-0019638	10-12-80	JP-C- 1277911	16-08-85
		JP-A- 55037152	15-03-80
		JP-B- 60000029	05-01-85
		WO-A- 8000574	03-04-80
		US-A- 4331767	25-05-82

GB-A-2213262	09-08-89	NONE	
